



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:** Virus de la inmunodeficiencia  
humana. Nuevas dianas terapéuticas

Autor: M<sup>a</sup> Isabel de Antonio Palomo

D.N.I.: 70261701J

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: 30 junio 2015

# Resumen

El tratamiento del VIH ha avanzado mucho en los últimos años, reduciendo en gran medida la morbimortalidad de la infección. Sin embargo, las terapias actuales, dirigidas contra dianas víricas como son la transcriptasa inversa, la proteasa o la integrasa no son capaces de curar a los pacientes VIH positivo y además han de ser tomadas de por vida. La imposibilidad de eliminar la infección, ya sea mediante una cura esterilizante o bien una cura funcional, se debe al fenómeno de latencia. En esta revisión se estudian dos dianas terapéuticas relacionadas con la latencia. La primera de ellas son los inhibidores de desacetilasas de histonas, como el vorinostat, que tratan de despertar el virus latente actuando sobre la disposición de la cromatina. La segunda son los análogos de proteínas quinasas, como la prostratina, que actúan a nivel de NFκB. Estos temas se encuentran en investigación y constituyen el principio de un largo y duro trabajo cuyo objetivo será la curación del VIH.

## Introducción y antecedentes

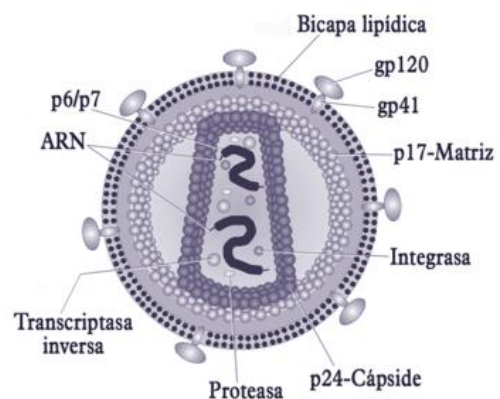
El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un microorganismo que ataca a las células del sistema inmunitario y las destruye o trastorna su funcionamiento, lo que acarrea el deterioro progresivo de dicho sistema y acaba produciendo una deficiencia inmunitaria<sup>1</sup>. Aunque se identificó en 1981, no fue hasta dos años más tarde, en 1983, cuando se le relacionó con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)<sup>2,3</sup>. Dicho trastorno se corresponde con el estado de la infección por el VIH caracterizado por bajos niveles de linfocitos CD4+ y la aparición de infecciones oportunistas<sup>4</sup>.

Los conocimientos del VIH, tanto de su biología, patogenia y terapéutica como de las consecuencias clínicas que produce la infección, han avanzado considerablemente<sup>3</sup>. En los últimos 15 años se ha producido un progreso en el tratamiento de la infección que ha mejorado la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes seropositivos<sup>5</sup>. La terapia antirretroviral es capaz de reducir la carga viral a valores no detectables tras unas semanas desde el inicio del tratamiento y de inducir el aumento del número de linfocitos CD4+ de un modo sostenido<sup>3</sup>. Actualmente, los fármacos que se encuentran en el mercado son los que se dirigen a dianas virales como la transcriptasa inversa, la proteasa y la entrada viral y frente a dianas celulares como el correceptor CCR5<sup>5</sup>.

A pesar de estos avances indiscutibles, el problema está lejos de ser resuelto. Incluso en países con pleno acceso a la terapia antirretroviral, la esperanza de vida de los individuos infectados es menor que la de aquellos que no lo están<sup>3</sup>. Se contabilizan 35 millones de personas que viven infectadas con el VIH en la actualidad, siendo el número de fallecidos al año por causas relacionadas con el SIDA de aproximadamente 1,6 millones<sup>7</sup>. El carácter de la enfermedad es, con las nociones que se tienen hasta el momento, de una patología crónica.

## Estructura de la partícula viral

El VIH forma partículas esféricas de un tamaño de 80-130 nm de diámetro. Su estructura está compuesta por una envoltura lípido-proteica procedente de la célula hospedadora en la que se anclan las glicoproteínas virales gp120 y gp41 y una nucleocápside central o core, de estructura tronco-cónica en cuyo interior se localiza el material genético y los enzimas necesarios para la replicación: transcriptasa inversa, integrasa y proteasa<sup>5</sup> (figura 1).



*Figura 1. Estructura del virión del VIH*

El VIH posee un genoma de dos copias de ARN de cadena simple (ss), que depende de una sola enzima para convertir su ARN genómico en ADN (proviral); la retrotranscriptasa. Este genoma contiene tres regiones codificantes; gag, pol y env, que codifican las proteínas de la cápside (Gag), las enzimas necesarias para la replicación (Pol) y la glicoproteína externa (Env). Las proteínas adicionales expresadas por el VIH son parte de la partícula viral (Vif, Vpr, Vpx), regulan directamente la expresión génica viral (Tat, Rev) o interactúan con la maquinaria celular para facilitar la propagación del virus (Vpu, Nef)<sup>8</sup>.

## Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VIH sigue, en general, las pautas del resto de retrovirus. Se divide en dos fases: fase temprana, que acaba con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula y fase tardía, que implica la transcripción del genoma viral y la generación de una progenie viral infectiva<sup>5</sup>. Después de que el virus alcanza la célula diana y logra penetrar a través de la membrana plasmática, la retrotranscriptasa convierte el ARN viral en ADN. El ADN retrotranscrito es transportado al núcleo e integrado en el ADN celular, proceso mediado por la integrasa. Después de la integración, el ADN retroviral (provirus) usa la maquinaria celular para expresar el ARN viral. El ARN genómico, junto a las proteínas virales, son ensamblados en la partícula viral, que sale de la célula e infecta nuevas células mediante la unión a receptores celulares específicos<sup>8</sup> (Figura 2).

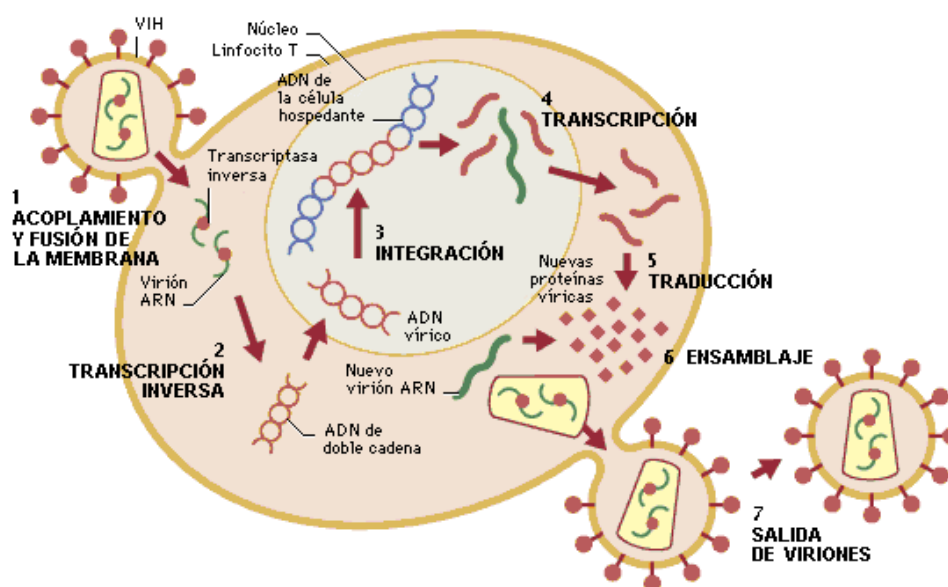


Figura 2. Fases del ciclo de replicación del VIH

### Fase temprana

#### Entrada del VIH en la célula: adsorción, fusión y desencapsidación

En primer lugar se produce la unión no específica del VIH a moléculas de membrana en tipos celulares que actúan como propagadores de la infección como las células dendríticas a través de receptores de lectinas. Esta unión facilita e incrementa la infección de los linfocitos circundantes. La entrada del virus en la célula se produce mediante la interacción con dos tipos de receptores. Por un lado, se produce la unión con un receptor

específico, común a todos los subtipos del VIH, la molécula de CD4+. Es también necesaria la unión del virus a los correceptores, que se corresponden con los receptores de quimioquinas: CCR5 y CXCR4. El CCR5 es el principal receptor de las cepas R5. El CXCR4 es el principal receptor de las cepas X4. Por último, las cepas llamadas de tropismo dual o R5X4, son capaces de unirse a ambos correceptores. Una vez que tiene lugar la interacción entre la gp120 y la molécula de CD4+, se producen una serie de cambios conformacionales que permiten que los receptores de quimioquinas se unan al virus por su proteína gp41. De esta manera se produce la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática, permitiendo la entrada del virus en la célula y su desencapsidación.

### Retrotranscripción

El proceso de síntesis de ADN a partir del ARN viral es realizado por el complejo enzimático de la transcriptasa inversa. Esta enzima carece de actividad exonucleasa, por lo que no es capaz de reparar sus errores, siendo ésta una de las causas por las que la variabilidad del VIH es tan elevada. Una vez sintetizado el ADN proviral, se acopla a una serie de factores celulares y virales, formando el complejo de preintegración que es transportado al núcleo.

### Integración

Cuando el complejo de preintegración ingresa en el núcleo, pasa a llamarse complejo de integración. Es entonces cuando el material genético se incorpora en el ADN por acción de la integrasa; proceso que se lleva a cabo mediante dos pasos: procesamiento 3' y transferencia de la hebra. La integrasa puede catalizar la escisión del ADN viral, proceso denominado desintegración, o bien la integración puede progresar, lo que implica la reparación del ADN por la maquinaria celular.

### Fase tardía

#### Latencia y reactivación

El genoma proviral integrado puede seguir un comportamiento variable. Puede permanecer latente durante un tiempo que varía de semanas a años, con una media de 10

años o bien puede replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada.

El principal factor celular implicado en el paso de la fase de latencia viral a la de reactivación es NFκB. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4+ en estado de reposo celular y es inducido únicamente en los procesos de activación inmunológica. Esto explica el que la replicación del VIH dependa exclusivamente de la activación de los linfocitos infectados. También es necesaria la presencia de la proteína viral tat para producir transcritos elongados.

#### Procesamiento y transporte

El ARNm viral se sintetiza en forma de un único transcrito que debe ser transportado al citoplasma y procesado en ARN de distintos tamaños. Ambos procesos, procesamiento y transporte, son realizados fundamentalmente por una proteína viral; rev, que tiene una localización preferentemente nuclear.

#### Traducción

Los diferentes procesamientos de los ARNm y los cambios de fase en la traducción de los ribosomas, darán lugar a las proteínas virales que ya podrán ser procesadas por las proteasas virales o celulares. La proteína vif funciona como adaptador para la degradación de APOBEC en el proteasoma. Sin su acción, APOBEC3G sería encapsulado en las nuevas partículas virales y produciría cambios en el proceso de retrotranscripción del ARN viral de un nuevo ciclo viral.

#### Morfogénesis y maduración

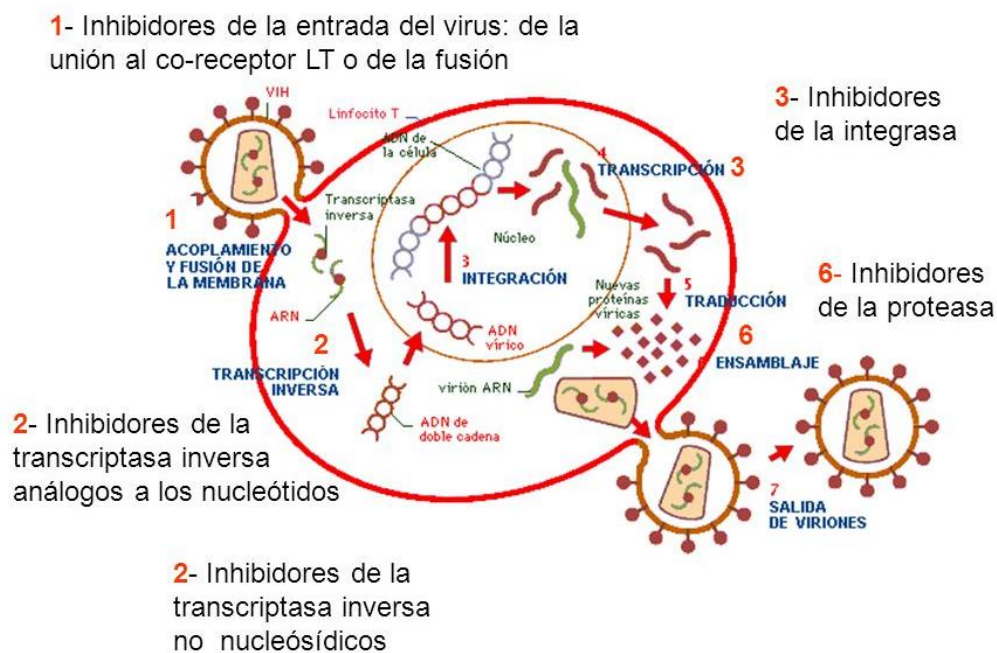
La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce en el momento final del ciclo infectivo, previo a la gemación de los virus a través de la membrana celular y permite generar una partícula viral madura.

### Tratamiento actual

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) se introdujo en el año 1996 y se compone del uso simultáneo de, al menos, 3 fármacos, de dos o más clases diferentes<sup>9</sup>. Los objetivos de esta terapia múltiple son: 1. Obtener sinergismo entre diferentes

compuestos actuando sobre distintas dianas moleculares. 2. Disminuir la dosificación de cada uno de los fármacos para así reducir los efectos secundarios tóxicos. 3. Reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia a los fármacos<sup>2</sup>. Las pautas recomendadas para el tratamiento inicial consisten en la combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa (TI) análogos de nucleósido o nucleótido (ITIAN) asociados a un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de la TI no nucleósido (ITINAN) o un inhibidor de la proteasa (IP)<sup>10</sup>. La también conocida como terapia antirretroviral combinada ha dado lugar a un aumento significativo en la supervivencia y calidad de vida, mediante la supresión de la replicación viral y el aumento de los niveles de CD4<sup>+</sup><sup>9</sup>. Especialmente importante es la adherencia al tratamiento, ya que tiene un papel primordial en el grado y la duración de la respuesta antiviral<sup>10</sup>.

## Dianas contra el VIH



*Figura 3. Principales dianas virales de inhibición del VIH*

Actualmente, el número de compuestos que van dirigidos hacia dianas virales es muy numeroso, superando los 20 fármacos. Además, existe una amplia combinación de dianas

celulares a las que dirigirse<sup>2</sup> (figura 3). El primer agente anti-VIH fue un inhibidor de la TI, la zidovudina, de la que se pudo disponer desde 1984. Durante una década se incorporaron nuevos inhibidores de la misma familia de análogos nucleósidos y en 1996 se comercializó el primer IP. Fue entonces cuando se pudo comenzar con la terapia antirretroviral combinada de 3 fármacos. En 1997 se incorporaron al arsenal terapéutico los ITINAN. En 2002 apareció el primer inhibidor de la entrada viral, el inhibidor de la fusión: enfuvirtida. En el año 2007 se presentó el primer inhibidor de la integrasa: el raltegravir (figura 3)<sup>11</sup>.

#### Inhibidores de la TI análogos de nucleósidos y nucleótidos

Esta familia está formada por zidovudina (AZT), dideoxicitidina (ddC), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC), didanosina (ddI), estavudina (d4T), abacavir (ABC) y tenofovir (TFV). Todos son análogos de nucleósidos, excepto TFV que es un análogo de nucleótido<sup>11</sup>. La diferencia entre los análogos de nucleósidos y los análogos de nucleótidos es que los primeros necesitan tres fosforilaciones para ser convertidos en su forma activa, mientras que los segundos solo necesitan dos. Además, los análogos de nucleótidos contienen un grupo fosfonato que no puede ser escindido por hidrolasas (esterasas), lo que haría más difícil dividir estos compuestos, una vez incorporado el extremo 3´terminal final, en comparación con sus homólogos de nucleótidos regulares<sup>2</sup>.

El mecanismo de acción de los ITIAN se produce de dos maneras. Por un lado, interaccionan con el sitio de unión de la enzima con su sustrato natural, es decir, el sitio de unión de los nucleótidos<sup>5</sup>. Para interactuar con la unión de sustrato-sitio, estos fármacos necesitan ser fosforilados a sus formas trifosfato (los inhibidores nucleosídicos) y difosfato (los inhibidores nucleotídicos)<sup>2</sup>. Por otro lado, actúan como terminadores de cadena en la síntesis del ADN genómico viral<sup>11</sup>.

#### Inhibidores de la TI no análogos de nucleósidos

Este grupo de fármacos está representado por los siguientes compuestos: nevirapina, delavirdina, efavirenz, etravirina y rilpivirina<sup>12</sup>. Interaccionan con la retrotranscriptasa mediante la unión a un sitio alostérico que modifica la afinidad de la enzima por sus sustratos. Para bloquear la actividad de la TI, los ITINAN establecen interacciones hidrófobas y electrostáticas con aminoácidos situados en la proximidad del centro catalítico de la enzima<sup>11</sup>.



### Inhibidores de la proteasa

Los inhibidores de la proteasa son diez; saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir y darunavir. La proteasa es la enzima encargada del procesamiento proteolítico del precursor de proteínas virales en las proteínas virales maduras<sup>2</sup>. La inhibición de esta enzima origina un procesamiento incompleto de las proteínas del core viral y genera partículas virales no infectivas<sup>11</sup>. Con la excepción de tripanavir (presenta una estructura cumarínica), todos los IP se basan en el principio del “peptidomimético”, según el que poseen dicha estructura pero con un enlace hidroxietileno en lugar de enlace peptídico, el cual no puede ser escindido<sup>2,5</sup>. Los IP se unen al sitio catalítico configurado por los dos monómeros que constituyen la proteasa del VIH bloqueando la acción de la enzima que procesa las poliproteínas precursoras gag/pol en sus productos finales<sup>11</sup>.

### Inhibidores de la integrasa

Es la familia de fármacos más nueva, compuesta por raltegravir, dolutegravir y elvitegravir, moléculas autorizadas por la FDA en 2007, 2013 y 2014, respectivamente<sup>12</sup>. Se indica en pacientes que nunca han recibido tratamiento antirretroviral o que han fracasado con múltiples fármacos previos. La integrasa del VIH tiene dos funciones catalíticas importantes: procesamiento 3' y transferencia de la hebra. Los inhibidores de la integrasa actúan sobre la reacción de transferencia de la hebra, de tal modo que se evita la integración del genoma del VIH en el genoma de la célula huésped. Los genomas del VIH que no se integran no pueden dirigir la producción de nuevas partículas virales infecciosas, con lo que se evita la propagación de la infección viral<sup>2</sup>.

### Inhibidores de la fusión

La enfuvirtida es el único fármaco de este grupo. Es un péptido sintético que interacciona con ciertas regiones de la glicoproteína viral gp41. Como consecuencia de esta interacción, la fusión del virus con la membrana celular externa se bloquea. Al tener una estructura peptídica, no es disponible por vía oral; debe ser inyectada por vía parenteral (concretamente vía subcutánea) dos veces al día, lo que hace que su uso a largo plazo sea problemático. Es por ello que se utiliza principalmente en el tratamiento de rescate como parte de las terapias de combinación<sup>2</sup>.

### Antagonistas de correceptor CCR5

Maraviroc es el único antagonista de CCR5 que ha sido aprobado para el tratamiento de la infección por el VIH y es el único fármaco que se dirige frente a una diana celular no viral. Es una molécula no peptídica derivada de piperidina que actúa mediante un mecanismo alostérico. Maraviroc se une al receptor en las regiones transmembrana 2 y 3 y fija el receptor en una conformación que impide la unión de la proteína gp120 del VIH a sus dominios de interacción con CCR5<sup>11</sup>.

El principal problema con los antagonistas de CCR5 es que solo son activos contra cepas R5 del VIH. Idealmente, un antagonista de CCR5 se debe combinar con un antagonista de CXCR4 para bloquear tanto las cepas R5 como las X4 del VIH. Sin embargo, no se dispone en la actualidad de ningún antagonista del correceptor CXCR4<sup>2</sup>.

## Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es el estudio bibliográfico de las nuevas terapias frente a la infección por VIH. Los problemas que se plantean son dos; 1. El paciente debe tomar la medicación durante toda su vida para poder ir controlando su enfermedad, con la consiguiente dificultad de cumplimiento del tratamiento y el consecuente gasto sanitario. 2. No existe una cura para dicha infección. Con esta revisión bibliográfica me propongo investigar si una nueva terapéutica en desarrollo sería capaz de hacer que el infectado no tuviera que tomar la medicación de por vida, no produciendo este hecho que la enfermedad no estuviera controlada. Para ello planteo:

- Revisión de la búsqueda de nuevas terapias en cura funcional o esterilizante mediante terapia farmacológica.
- Estrategia "*shot and kill*". Combinación de la TARGA con reactivadores de latencia.
- Estudios clínicos en inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs) y análogos de proteínas kinasas (PKCs).

## Metodología

Se realizó un trabajo bibliográfico, basado en la búsqueda de artículos científicos en bases de datos, principalmente PubMed.

## Resultados

Son muchos los éxitos que se han logrado hasta el momento con la terapéutica descrita anteriormente. Más de 20 medicamentos antirretrovirales diferentes están ya disponibles en muchos países de la geografía mundial. Usándolos de un modo combinado mejoran la salud y prolongan la vida de los infectados por el VIH y además reducen las tasas de transmisión. Sin embargo, estas terapias no restablecen plenamente la salud o un estado inmune normal en los individuos infectados y los pacientes aún experimentan comorbilidades. Además, la interrupción de la terapia antirretroviral lleva consigo, en prácticamente todos los casos, a la reaparición de la replicación viral detectable y la progresión del SIDA<sup>13</sup>.

En lo que se refiere al valor económico, el coste de la terapia antirretroviral ha disminuido considerablemente en los últimos años y la disponibilidad de dichos medicamentos en entornos de escasos recursos ha aumentado constantemente. Sin embargo, el gasto que supone facilitar el tratamiento a los 35 millones de personas que actualmente están infectadas por el VIH es abrumador para muchas organizaciones y sistemas de salud pública. Se estima que por cada persona infectada por el VIH que inicia la terapia antirretroviral, otras dos personas se infectan; esto es claramente insostenible. La continua presencia a nivel mundial de un gran número de personas infectadas por el VIH y no tratadas –que son la principal fuente de transmisión continua– significa que la población infectada es probable que crezca. Teniendo en cuenta estos problemas, hay un creciente interés en el desarrollo de estrategias curativas para abordar la infección por el VIH<sup>13</sup>.

Tradicionalmente, los investigadores han previsto una “cura esterilizante”, que se corresponde con la eliminación de todas las células infectadas por el VIH. Sin embargo, se ha observado que puede no ser necesario acabar con todas esas células infectadas para controlar la infección. La “cura funcional” consiste en la generación de la inmunidad del

hospedador eficaz contra el VIH que resultaría en el control del virus durante toda la vida en ausencia de terapia, a pesar de no lograr la erradicación completa del VIH<sup>13-15</sup>.

Se han estudiado algunos sucesos de pacientes singulares, que nos van acercando cada vez más al objetivo deseado. El “bebé Mississippi” parecía ser el primer caso de cura funcional en un niño. Nacido en 2010 e infectado por el VIH, se le administró tratamiento antirretroviral desde las 30 horas de vida. Recibió el tratamiento durante 18 meses. Tras dos años sin medicación, no se registraban en esta niña señales del virus activo, lo que avivaba las esperanzas de encontrar una posible cura para el SIDA. Se postuló la posibilidad de que el tratamiento temprano podría prevenir la formación de reservorios latentes. Sin embargo, en julio de 2014 se volvieron a detectar niveles del virus en la sangre de la niña, lo que abatió en cierta medida las esperanzas de los investigadores hacia la posible cura del VIH<sup>14,15</sup>.

El primer y único caso de cura esterilizante fue Timothy Brown, el paciente de Berlín. En 2007, Brown se sometió a un trasplante de médula ósea después del tratamiento sin éxito para la leucemia mieloide aguda con la quimioterapia convencional. El donante de médula ósea seleccionado fue homocigoto para una mutación en el gen CCR5, impidiendo la expresión del correceptor CCR5 de VIH en la superficie de las células T y que confiere un alto grado de resistencia natural a la infección por el VIH. Tras el trasplante, el paciente dejó de tomar el tratamiento antirretroviral, y hasta el momento, después de ocho años, permanece libre de la infección. Los investigadores hicieron seis trasplantes más de médula ósea en otros seis pacientes VIH positivo con donantes que tenían la misma mutación en CCR5. En este caso, todos los individuos murieron dentro del año siguiente debido a recaídas o rechazo de trasplante. En uno de ellos, el rebote del VIH se produjo mediante el correceptor alternativo de células T; CXCR4, lo que sugiere una limitación potencial para apuntar solo a CCR5<sup>14-16</sup>.

Dos pacientes en Boston fueron sometidos a trasplante de médula ósea utilizando un donante con el tipo salvaje de CCR5 y su viremia se redujo a niveles indetectables, que duraron varios años. Sin embargo, al poco tiempo de dejar la terapia antirretroviral, se produjo un rebote en ambos, lo que implica que la mutación de CCR5 fue crítica para curar el VIH del paciente de Berlín. Esto ha llevado a los investigadores a otra estrategia para erradicar el VIH: el uso de la terapia génica para anular la expresión de CCR5<sup>14</sup>.

Por último cabe destacar el caso de la cohorte VISCONTI, formada por 14 pacientes franceses que comenzaron el tratamiento antirretroviral muy poco después de infectarse. Cuando detuvieron su tratamiento, no se produjo rebote alguno en ninguno de ellos. Aún tenían niveles detectables de VIH, pero en pequeños embalses, aunque podrían servir como una futura fuente de reactivación. Se trataría por tanto de una cura funcional. La similitud que unía a estos pacientes era que todos comenzaron el tratamiento muy poco tiempo después de infectarse, lo que indica que el inicio del tratamiento durante la infección primaria por VIH podría ser importante para controlar el virus<sup>14</sup>.

En el momento en el que se detiene la terapia antirretroviral, la producción de virus aumenta rápidamente y la enfermedad puede progresar, produciéndose el fenómeno conocido como rebote. Este rebote se debe a que el VIH constituye un depósito en las células T de memoria que persiste a pesar del tratamiento. En las células activadas, el ADN proviral puede dar lugar a ARNm viral, proteínas y partículas virales infecciosas. Sin embargo, en algunas células infectadas, el virus entra en un estado de reposo denominado infección latente en el que la transcripción y traducción están restringidos pero la integración del VIH sí que se ha producido. Estas células con infección latente constituyen el reservorio de VIH y, eventualmente, pueden ser estimuladas para producir virus infecciosos<sup>14</sup>. En otras palabras, la verdadera latencia se define como el mantenimiento en el genoma del hospedador del ADN viral integrado que es de replicación competente, pero transcripcionalmente silencioso<sup>13</sup>.

La peculiaridad de las células infectadas de forma latente es que no producen antígenos del VIH y son, por lo tanto, indistinguibles de las células no infectadas. Este silencio transcripcional hace que esas células sean invisibles para el sistema inmune y permite la persistencia del provirus en el tiempo. Despertar el virus de su estado latente podría ser la clave para erradicar el depósito ya que de esta manera la vigilancia inmune o el tratamiento antirretroviral podrían ser capaces de terminar con la infección<sup>14</sup>.

Las células T de memoria central (TMC) han sido descritas como el depósito celular predominante de la infección latente por el VIH. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la infección latente también está presente en las células T de memoria transitorias (TMT), en particular en pacientes cuyos recuentos de células T CD4+ se mantienen bajos a pesar de la administración de la TARGA. Las células T efectoras de memoria (TEM) forman un pobre reservorio celular para la infección latente del VIH porque son más propensas a la muerte celular inducida por activación de TMC o TMT. Debido a su rápida

rotación, no contribuyen significativamente a la reserva de células de memoria latentes. También se han sugerido otros tipos de células como reservorios, pero su prevalencia y la cinética de la persistencia no están todavía bien caracterizados. Éstas incluyen las células T CD4<sup>+</sup> en reposo, las células madre hematopoyéticas y una fuente no identificada en la sangre<sup>17</sup>.

En este trabajo se describirán dos posibles maneras de llegar a esas células con infección latente; por un lado se tratarán los inhibidores de histonas y por otro los análogos de proteínas kinasas (PKCs).

En cuanto a los inhibidores de histonas, se trata de una familia cuyo mecanismo de acción se encuentra a nivel transcripcional. La transcripción del ADN proviral del VIH requiere de una serie de factores, que han de ser adecuados para que se produzca la misma. Uno de ellos es la disposición de la cromatina alrededor del sitio de integración viral, que constituye un importante regulador del estado transcripcional. Una alta acetilación de histonas en el extremo 5' terminal se asocia con una estructura de cromatina accesible, favoreciendo la transcripción. Por el contrario, una baja acetilación de histonas dificultará el proceso. El estado de acetilación se mantiene por un equilibrio entre histona acetiltransferasas, que actúan para promover la acetilación y desacetilasas de histonas (DACH), que disminuyen la acetilación. Los inhibidores de DACH son fármacos que promueven la acetilación no específica y activan las células infectadas de forma latente<sup>14</sup>.

El vorinostat o ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) es un potente inhibidor de DACH cuyo uso está aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer. Además, se está estudiando con el fin de determinar su eficacia como parte de una estrategia para curar el VIH. Concretamente, se encuentra en ensayos de fase II de investigación clínica<sup>18</sup>. A concentraciones clínicamente relevantes, inhibe la DACH de clase I más importante para la represión del VIH e induce la producción de virus *in vitro* de las células T CD4<sup>+</sup> en reposo de pacientes VIH positivo en tratamiento antirretroviral con niveles de plasma de ARN del VIH por debajo del límite de detección<sup>19</sup>.

Archin et al. midieron directamente la actividad de vorinostat en ocho pacientes con tratamiento antirretroviral suprimido. Se les administró una dosis de 400 mg de vorinostat y se midió el cambio de expresión de ARNm de VIH en células T CD4<sup>+</sup> de reposo durante las 4-7 horas siguientes a la administración del fármaco. Se observó un aumento de la expresión de ARN en 4,8 veces y se incrementó significativamente en comparación con

la expresión previa a la exposición sobre la línea base en los ocho pacientes. Este hallazgo demuestra directamente que una sola dosis de un inhibidor de DACH *in vivo* puede interrumpir la infección latente, al menos dentro de una proporción detectable del reservorio de la infección persistente dentro de las células T CD4+ en reposo. Se están realizando estudios clínicos de dosis múltiples de vorinostat, tratando de definir el potencial del fármaco para agotar la infección latente y para afectar a una proporción importante de células con infección latente. Una cuestión interesante con respecto a este enfoque es si la expresión de VIH será suficiente para eliminar estas células<sup>19,20</sup>.

Otro estudio se realizó sobre 20 personas infectadas por VIH que se encontraban en tratamiento antirretroviral. Se les administraron 400 mg de vorinostat por vía oral una vez al día durante 14 días. El fármaco fue seguro y bien tolerado y no hubo modificaciones en la dosis ni interrupciones en la toma del medicamento. Los niveles del ARN del VIH en sangre aumentaron significativamente en 18 de 20 pacientes (90%), se elevaron 8 horas después de la administración de SAHA y se mantuvieron altos hasta 70 días después de la última dosis. El vorinostat indujo un aumento significativo y sostenido en la transcripción del VIH de latencia en la mayoría de los pacientes infectados por el VIH<sup>21</sup>.

Por otro lado se encuentran los análogos de PKCs. La proteína kinasa C de señalización juega un papel importante en la activación del factor nuclear de las células T activadas (NFAT), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) y la proteína activadora 1 (AP-1), pasos que son esenciales para la activación de células T. El VIH contiene sitios de unión para esos factores, que tienen un papel demostrado en la activación de la expresión viral. NFκB, en particular, desempeña múltiples funciones en la transcripción del VIH<sup>22</sup>. En concreto, se trata de un factor del hospedador importante que promueve la replicación del VIH durante la infección aguda<sup>17</sup>.

La vía de señalización NFκB influye en el establecimiento, mantenimiento y pérdida de la latencia del VIH a través de diversos efectos sobre la transcripción del VIH y la supervivencia de las células T de memoria. NFκB ayuda a asegurar la supervivencia de las células T durante la diferenciación inicial de las células efectoras en células de memoria. Receptores de co-estimuladores en la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) inducen la expresión de NFκB dependiente de genes antiapoptóticos. Sin embargo, la señalización de NFκB más fuerte y prolongada puede frustrar el establecimiento de un depósito celular latente debido a sus efectos en la activación de los Long terminal repeats (LTRs), secuencias promotoras del ADN proviral integrado. De

esta manera, para que se establezca la latencia, las actividades que se encuentran en competencia, deben estar cuidadosamente equilibradas. La activación de las células debe ser subóptima y la actividad de NF $\kappa$ B debe ser suficiente para promover la supervivencia celular, pero no tan grande como para fomentar la expresión del provirus<sup>17</sup>.

La prostratina es un éster de forbol que fue aislado de *Homolanthus nutans*, un arbusto original de Nueva Zelanda<sup>23</sup>. A día de hoy este compuesto se puede sintetizar<sup>24</sup> y obtener de esta manera mayores cantidades de producto, lo que ha impulsado su investigación para el posible uso en la terapia del VIH. La prostratina estimula la actividad de PKCs y con ello reduce la latencia del VIH<sup>23</sup>. No induce los factores NFAT ni AP-1, sino que únicamente actúa sobre NF $\kappa$ B. A diferencia de otros ésteres de forbol que inducen la carcinogénesis mediante la activación de la PKC, la prostratina no produce tumores, sino que ha demostrado poseer una actividad supresora de los mismos<sup>23</sup>.

La señalización del calcio a través de la calcineurina ha demostrado potenciar la activación inducida por la prostratina promoviendo la acción de NF $\kappa$ B, a su vez que estimula el VIH latente. En otras palabras; cuando estimulamos la vía de calcio/calcineurina en presencia de bajos niveles de prostratina, se fomenta su eficacia. Enfoques innovadores tratan de explotar las acciones sinérgicas de la calcineurina y la prostratina en ausencia de activación de células T generalizada como un medio para atacar al reservorio viral latente<sup>25</sup>.

Uno de los miembros de la familia NF $\kappa$ B de factores de transcripción, p50, parece jugar un papel activo en el mantenimiento de la latencia del VIH. p50 recluta DACH, que promueven un estado hipoacetilado en la cromatina que le rodea. Los inhibidores de DACH por sí solos pueden inducir la transcripción del VIH latente, pero la adición de un agonista de PKC favorecerá en gran medida el proceso<sup>17</sup>.

## Discusión

Las nuevas terapias que se encuentran en investigación para actuar sobre la latencia del VIH son muy significativas en este ámbito. Se deben seguir estudiando, ya que suponen un foco importante sobre el que trabajar en la línea del VIH. Sin embargo, no todo es de color de rosa, sino que existen algunas consideraciones de relevancia que se han de tener en cuenta a la hora de continuar con la investigación.



Uno de los problemas al que se enfrentan los investigadores en la evaluación de las estrategias de curación del VIH es medir el tamaño del reservorio latente. Existen varios ensayos para cuantificar el depósito, cada uno con limitaciones significativas. Es probable que estos ensayos sobre- o subestimen su tamaño. Por ejemplo, las estimaciones del número de copias del DNA proviral incluyen un gran número de virus integrados que parecen ser no funcionales. Alternativamente, el ensayo utilizado para medir solo copias competentes para la replicación del virus puede subestimar el número real, ya que puede no activar todas esas copias<sup>14</sup>.

En ausencia de métodos robustos para la detección de células con infección latente, la interrupción del tratamiento sigue siendo la única manera de probar intervenciones de curación del VIH. Sin embargo, cesar la terapia antirretroviral conllevaría el riesgo de rebote de la infección y aumento de los niveles de carga viral, lo que podría afectar a la progresión de la enfermedad y permitir la transmisión del virus<sup>14</sup>.

Intervenir con terapias potencialmente tóxicas a pacientes que siguen perfectamente su terapia antirretroviral necesita una evaluación cuidadosa<sup>15</sup>. Aunque el beneficio potencial para la humanidad de erradicar el VIH es grande, es poco probable que los participantes de los ensayos obtengan beneficios directos, más tratándose de una fase temprana de investigación<sup>13,15</sup>. Estudios que involucran prácticas como interrupciones de tratamiento, procedimientos invasivos y otros, conllevan riesgos desconocidos y posiblemente significativos para los voluntarios<sup>13</sup>. La evidencia de resultados adversos después de la interrupción del tratamiento proviene del estudio SMART, en el que dicha interrupción se asocia con una mayor mortalidad y morbilidad y con infecciones oportunistas<sup>14</sup>. Además es esencial proporcionar un consentimiento informado cuidadoso, ya que la investigación dirigida a una cura puede aumentar las expectativas entre los participantes. Ese consentimiento tendrá que ser detallado y explicar el balance beneficio/riesgo<sup>13</sup>.

Por otro lado, Lillian Cohn, de la universidad de Rockefeller, y sus colegas trataron de probar la hipótesis latente-reservorio en la que el virus se integra principalmente en el genoma de una célula T de memoria. Para demostrar esa idea, amplificaron y secuenciaron el ADN viral integrado (provirus) a partir de las células T de pacientes infectados para determinar si cada integración era única o una copia entre muchas células clonadas. De los 75 clones analizados, ninguno tenía una copia intacta del genoma viral y la mayoría de ellos eran inactivos. Esta secuenciación de sitios de integración del VIH

sugiere que las poblaciones de células T clonales ampliadas podrían no ser la principal fuente de virus latente<sup>26</sup>.

A pesar de esto, los autores del artículo señalan que es posible que alguna copia de ADN viral intacto podría estar oculta en la población clonal ampliada. Lisa Frenkel, investigadora de enfermedades infecciosas en la Universidad de Washington está de acuerdo. Además, cita reciente evidencia de un paciente de SIDA cuyas células T clonales ampliadas produjeron niveles detectables de virus en el torrente sanguíneo del paciente, lo que sugiere que las células clonales pueden, al menos en algunas ocasiones, esconder el reservorio del virus latente<sup>26</sup>.

## Conclusión

- Aunque se hayan reportado varios casos de posibles curas funcionales que al final no han sido satisfactorias, sí se ha dado un caso de cura esterilizante. Se está estudiando una terapia prometedora, basada en inhibidores de HDACs y análogos de PKCs.
- El uso simultáneo de la TARGA y los reactivadores de latencia podría llegar a erradicar la carga viral en los organismos infectados. Los inhibidores de HDACs y los análogos de PKCs se encargarían de despertar las células latentes para que la TARGA pudiera actuar sobre ellas.
- Los estudios clínicos en inhibidores de HDACs y análogos de PKCs han demostrado un aumento en la expresión de los niveles de ARN viral, lo que demuestra eficacia en cuanto a reactivación de la latencia.

## Bibliografía

1. Organización Mundial de la salud [Internet]. OMS 2015. [Citado 20 Abr 2015] Disponible en [http://www.who.int/topics/hiv\\_aids/es/](http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/)
2. De Clerck E. Anti HIV-drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of the HIV. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33:307-320.
3. Palmisano L, Vella S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Ann Ist Super Sanita* 2011; 47:44-48.

4. Todo lo que necesitas saber sobre el VIH y el sida [Internet]. Janssen-Cilag S.A. 2006-2015. [Última actualización: 21 Abr 2015; citado 24 Abr 2015]. Disponible en <http://www.infosida.es/que-es-el-vih>
5. Alcamí J, Bedoya LM. El estudio de la interacción virus-hospedador como fuente de nuevas dianas en la infección por el VIH. *Enf Emerg* 2005; 7:58-66.
6. Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, Opravil M, Furrer H, Telenti A et al. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years. *Arch Intern Med* 2003; 163:2187-2195.
7. ONUSIDA informe Ginebra 16 de julio de 2014. [Citado 26 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.unaids.org/es/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2014/july/20140716prgareport>
8. Santana A, Domínguez C, Lemes A, Molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Rev Diagn Biol* 2003; 52:0034-7973.
9. Author Manuscript. Life expectancy of individual on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. *Lancet* 2008; 372(9635):293-299.
10. Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Recomendaciones de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [actualizado Ene 2015; citado 2 May 2015]. Disponible en: <http://www.gesida.seimc.org/>
11. Alcamí J. Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Supl 12:3-10.
12. Education materials. Offering information on HIV/AIDS Treatment, Prevention and Research. [Internet]. 2015 [Última actualización: 05 Abr 2015; citado 05 May 2015]. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>
13. The International AIDS Society Scientific Working Group on HIV cure. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol* 2013; 12(8): 607-614.
14. Martin G, Pace M, Frater J. Hidden Menace. Curing HIV means finding and eradicating viruses still lurking in the shadows. *The Scientist* 1 May 2015. Disponible en: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/42831/title/Hidden-Menace/>
15. Lewin SR. A cure for HIV: where we've been, and where we're headed. *Lancet* 15 Jun 2013; 381(9883):2057-2058.
16. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mubig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta 32/Delta 32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360:362-98.

17. Chan JKL, Greene WC. NF- $\kappa$ B/Rel: agonist and antagonist roles in HIV-1 latency. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; 6(1):12-18.
18. Infosida. Base de datos de medicamentos. Vorinostat. [Actualizado 7 May 2014; citado 21 May 2015]. Disponible en: <https://infosida.nih.gov/drugs/529/vorinostat/0/patient>
19. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruk JD, Crooks AM et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 2013; 487(7408):482-485.
20. Margolis DM, Hazuda DJ. Combined approaches for HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS* 2013; 8(3):230-235.
21. Elliot JH, Wightman F, Solomon A, Ghneim K, Ahlers J, Cameron MJ et al. Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *Plos pathogens*. November 2014. Volume 10. Issue 11. E1004473
22. Coudhary SK, Margolis DM. Curing HIV: pharmacologic approaches to target HIV-1 latency. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51:397-418.
23. Miana GA, Riaz M, Hussan SU, Paracha RZ, Paracha UZ. Prostratin: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2015. PMID:25963564 PubMed.
24. Wender PA, Kee JM, Warrington JM. Practical synthesis of prostratin, DPP and their analogs, adjuvant leads against latent HIV. *Science* 2008; 320(5876):649-652.
25. Chan JK, Bhattacharyya D, Lassen KG, Ruelas D, Greene WC. Calcium/calcineurin synergizes with prostratin to promote NF- $\kappa$ B dependent activation of latent HIV. *Plos one* 2013 8(10):e77749. doi:10.1371/journal.pone.0077749.
26. Cohn LB, Silva IT, Oliveira TI, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 2015; 160:420-32. Disponible en: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/42792/title/Looking-for-Latent-HIV/>